

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Az autofágia folyamatának vizsgálata rovar modellszervezeteken



Készítette:
Dr. Csikós György

Készült az Eötvös Loránd Tudományegyetem
Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékén
Témavezető: Sass Miklós DSc. Habil., egyetemi tanár

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola
Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Doktori Program
A Doktori Iskola vezetője: Prof. Erdei Anna
Programvezető: Prof. Sass Miklós
Budapest
2012.

花鳥風月

1. Bevezetés

Az eukarióta sejtek alapvető sejtbiológiai folyamatai közül az autofágia (a sejtek önmésző folyamata) elsősorban a hosszú életidejű fehérjék lebontásáért, valamint a sérült, vagy elöregedett sejtorganelumok és a körülöttük lévő citoplazma eltávolításáért felelős. Stressz hatásokra válaszolva, a sejtek szintén citoplazmájuk egyes részeinek autofágia útján történő lebontásával biztosítják a túlélésükhöz szükséges monomereket, illetve energiát. Az autofágia ezekben az esetekben tehát a sejt homeosztázisának fennmaradását szolgálja. Érdekes módon, a fejlődő szervezetek eltávolításra ítélt szöveteiben és sejtjeiben a szükséges fejlődési fázisban endogén indukció hatására megjelenő autofág folyamatok az adott struktúra elpusztulásához és lebomlásához vezetnek. Ilyenkor viszont az autofágia - az apoptózis, azaz a programozott sejthalál (PCD) I. típusa mellett - a PCD II. típusaként jelenik meg.

Valamennyi, az előbbieken felsorolt esetben a morfológiailag azonosítható és az autofágiához kapcsolható struktúrák megjelenését gének egy jól körülírható csoportjának aktiválódása előzi meg, amelyek által kódolt fehérjék nélkülözhetetlenek ebben a lebontó mechanizmusban. Az autofág folyamatok irányításában részt vevő gének és termékeik ezen túlmenően rész vesznek az embrionális és posztembrionális fejlődésben, a tumorok kialakulásában és a neurodegeneratív betegségek megjelenésében, valamint az öregedési folyamatokban és az élethossz szabályozásában.

Egy rendkívül hatékony mechanizmus biztosítja azt, hogy - akár külső, akár belső változások hatására - a sejtek gyors autofág választ adjanak, ezáltal alkalmazkodva a megváltozott körülményekhez vagy követelményekhez. A folyamat központi regulátora a TORC1 (target of rapamycin kinase complex 1), amely az autofágia indukciójában részt vevő fehérjéket foszforilált, inaktív állapotban tartja, és ilyen módon gátolva a kettős izoláló membrán, kialakulásához, vagyis az autofágia iniciálásához vezető lépéseket.

Ez a sok alegységből álló multiprotein komplex, integrálva a tápanyag-ellátottság és a stresszhatások jeleit, a növekedési faktorok vagy hormonok jelenlétét ill. hiányát, valamint a sejt által felhasználható energia mennyiségét, képes szabályozni a sejt metabolizmusát és növekedését. Mind az élesztő, mind a soksejtű eukarióták esetében a TORC1 által regulált lebontó folyamatokban elsősorban az *atg* (autophagy-related) gének - vagy ezek ortológjainak - termékei találhatók. Ezek fontos szerepet játszanak az élesztőben a pre-autofagoszómális struktúra (PAS), illetve a magasabbrendű eukariótákban a fagofór kialakításában, növekedésében

és záródásában (azaz autofagoszómává alakulásában), továbbá elősegítik lizoszómákkal való egyesülését.

Az autofágiához vezető folyamat első lépése az, hogy a TORC1 inaktíválódása következtében az Atg13 részlegesen defoszforilálódik, és hozzákapcsolódik az Atg1/ULK1/2 fehérjéhez. Az együtteshez az élesztő esetében az Atg17, majd ezt követően az Atg11, az Atg29 és végül az Atg31 kapcsolódik. A PAS területén kialakuló komplex segít összetoborozni a fagofór létrehozásához szükséges további fehérjéket. Ennek következtében jelenik meg ezen a területen a Vps15 (vacuolar protein sorting 15), Vps34/PI3K, Vps30/Atg6/Beclin1 és Atg14 fehérjékből álló komplex, amelynek nélkülözhetetlen szerepe van a membránokban lévő foszfatidilinozitol molekulák foszforilálásában és így az izoláló membrán kialakításában is.

Az ezt követő lépésben az Atg12 konjugációs rendszer működése létrehozza az Atg12, Atg5 és Atg16 fehérjékből álló multimer komplexet, amely a növekedő fagofórhoz kapcsolódik, és annak kiteljesedését segíti egészen az autofagoszómává történő záródásáig. Az Atg8 konjugációs rendszer foszfatidiletanolamint köt az aktivált Atg8 molekulára, aminek következtében az eddig szolubilis Atg8 membránkötött fehérjévé válik és a továbbiakban mint strukturális alkotóelem, a fagofór membránjának mindkét oldalához kötődve részt vesz annak folyamatos növekedésében.

Enzimek hiányában a fagofór záródásával még nem kezdődik meg a bekebelezett citoplazmarészlet és a benne lévő sejtorganellek lebontása. Ez a folyamat csak akkor indul meg, amikor a fagofór elsődleges vagy másodlagos lizoszómákkal egyesül. Az ekkor kialakuló autofagoszóma beltartalma gyorsan lebomlik, és a monomerek visszakerülnek a citoplazmába.

A teljes átalakulással fejlődő (holometabola) rovarok ideális alanyai az autofágia kutatásának. Egyfelől, mivel a poszt embrionális fejlődésük során gyakorlatilag folyamatosan táplálkoznak és növekszenek, ezért az aminosavak megvonásra igen gyors és erőteljes autofágválaszt produkálnak. Másfelől viszont, a metamorfózist közvetlenül megelőző időszakban - hormonális hatásra - a lebontandó lárvális szervekben fiziológiásan is autofágia indukálódik, amely végül, a bábállapot során ezen szervek elpusztulásához és lebomlásához vezet. Bár sokféle rovar használatos az autofágia vizsgálatára, közülük messze kiemelkedik a *Drosophila melanogaster*, rövid életciklusával, könnyű tenyésztetőségével, a közel egy évszázada tartó genetikai vizsgálatának eredményeivel, hatalmas, és állandóan bővülő mutánsparcjával, valamint azzal a hihetetlenül széles spektrumú molekuláris-genetikai eszköztárral, amely sikerrel alkalmazható ezen a modellszervezeten.

2. Célkitűzések

2.1. A cAMP szerepe az autofágia szabályozásában

Az autofágia regulációjában számos kináz és foszfatáz vesz részt, egymással rendkívül kifinomult kölcsönhatási hálózatot alkotva. Ezek hatását nagymértékben befolyásolja a sejt cAMP tartalmának alakulása, amely befolyással van az autofág folyamat indukciójára is. Kísérleteinkben a vedlési hormon és a cAMP szint alakulásának összefüggéseit vizsgáljuk meg a fejlődési autofágia időszakában.

2.2. A heterofág úton kialakuló protein granulumok enzimtartalmának eredete.

Az autofágiával párhuzamosan a holometabola rovarlárvák trofocitái jelentős heterofág (endocitotikus) aktivitást is mutatnak. Az ennek során formálódó protein granulumok enzimtartalmának előállítására a már degradálódó zsírtest-sejtek nem képesek. A paranitrofenil-foszfatáz aktivitást mutató fehérjét felismerő antiszérum segítségével megvizsgáljuk, hogy létezik-e az enzimet inaktív formában raktározni képes szövetfésülés a lárvák szervezetében.

2.3. Az autofágiaiban részt vevő gének homológjainak vizsgálata *Drosophila* lárvában

Az autofágia gének ecetmuslicában fellelhető homológjainak azonosítását követően célul tűztük ki, hogy egy kiválasztott gén (Aut1/Apg3, az Aut7/Apg8 ubiquitinszerű konjugációs rendszer E2 típusú enzime) *Drosophila* homológjának vizsgálatával igazoljuk annak autofágiaiban játszott szerepét, valamint hogy - funkcióvesztéssel állatok létrehozásával – képet kapjunk az autofágia szükségességéről az egyedfejlődés során.

2.4. Új, az autofágiaiban részt vevő gének felkutatása P-elem inzerciót hordozó *Drosophila* mutánsparcok segítségével

Az autofág mechanizmusban defektust mutató törzsek kiválasztása fény- majd az ezt követő elektronmikroszkópos vizsgálattal. 20-hidroxiekdizon kezeléssel kisselektáljuk azokat a vonalakat, amelyekben nem az autofágiát, hanem a folyamatot kiváltó vedlési hormon bioszintézisét érinti a mutáció. A P-elem beépülési helyének meghatározását követően a Flybase adatbázis segítségével azonosítjuk az érintett, autofág fenotípust

okozó gént. Végezetül a P-elem remobilizálásával igazoljuk, hogy ténylegesen az adott génbe beépült transzpozon, nem pedig egy háttérmutáció okozta az autofág fenotípust.

2.5. Az *snf4ay* (AMPK) szerepe az autofág folyamatok szabályozásában

Az I(3)S005042-es vonal megfelelt az előző pontban leírt feltételeknek, és az általa hordozott P-elem az *snf4ay* génben foglal helyet. A gén érintettségét az autofág fenotípus kialakításában egy *snf4ay*-RNAi konstrukció előállításával, illetve az ennek segítségével létrehozott transzgén lárvák vizsgálatával igazoljuk. A gén egyik exonját klónozva, arról fehérjét termeltetünk, majd antiszérumot állítunk elő. Ez felhasználva, Western bloton megvizsgáljuk, hogy hogyan alakul az Snf4ay mennyisége a lárvális zsírtestben a posztembrionális fejlődés idején, továbbá immunhisztokémiai módszerrel nyomon követjük a fehérje lokalizációját az utolsó lárvastádium idején.

2.6. Az *lqf* gén jelentősége az auto- és heterofág folyamatokban

Az I(3)S011027-es vonalban mutáció az *liquid facets* (*lqf*) gént érintette. Mivel ezeknek a lárváknak a zsírtest-sejtjei sem auto- sem pedig heterofág eredetű granulumokat nem tartalmaztak, ezért megvizsgáljuk, hogy az adott gén milyen szerepet játszhat ezekben a folyamatokban. A gén expressziójának változását az utolsó lárvastádium alatt, illetve éhezés hatására szemikvantitatív reverz transzkriptáz PCR módszerrel mutatjuk ki. *Lqf*-RNAi konstruktot hordozó transzgén állatok előállításával igazoljuk, hogy ténylegesen ennek a génnek a hibája okozza a fenotípust. Specifikus antiszérum előállítása után immunhisztokémiai módszerrel megnézzük, hogy az *Lqf* fehérje milyen lokalizációt mutat az utolsó lárvastádium idején, továbbá, hogy mutat-e kolokalizációt a már ismert autofágia markerekkel. Ellenőrizzük, hogy a mutációt hordozó zsírtest-sejtek tényleg képtelenek a szérum fehérjék receptor-mediált endocitózisára. Rapamicin kezeléssel megpróbáljuk behatárolni, hogy az *Lqf* az autofág folyamatban a TOR-hoz képest azt megelőzően, vagy pedig az után játszik fontos szerepet. Végezetül megvizsgáljuk, hogy a mutáció hogyan hat az egyedek élethosszára.

3. Alkalmazott módszerek

3.1. In vivo kezelések

A lárvák testébe részben mikroinjekcióval, részben etetés útján juttattuk be az autofágiát befolyásoló vegyületeket. Az autofágia kiváltására aminosav megvonást alkalmaztunk.

3.2. cAMP tartalom meghatározása

Ezt a vizsgálatot kompetitív fehérje kötő módszerrel (competitive protein binding assay) végeztük

3.3. A szövetek savas foszfatáz tartalmának és aktivitásának meghatározása

Az enzimaktivitás-mérést fotometriával, a p-nitrofenil-foszfat bontás alapján vizsgáltuk, az enzimtartalom meghatározása ELISA-val történt.

3.4. Ellenanyag termeltetés

Az immunizáláshoz szükséges fehérjét vagy klasszikus módon izoláltuk, vagy klónozás útján, mint rekombináns fehérjét állítottuk elő.

3.5. Molekuláris biológiai eljárások, klónozás

Az RNAi-, GFP-, menekítő konstrukciókat kitek segítségével, a molekuláris biológiai laborokban szokásos módszereket követve készítettük (PCR, restrikciós enzimes hasítás, ligálás, transzformálás, plazmid izolálás).

3.6. Transzgén állatok létrehozása

A donor konstrukciók embriókba injektálását részben mi magunk, részben a Szegedi Drosophila Transzformáló Szolgálat végezte. A kikelő állatok utódaiból az adott transzgént kromoszómálisan hordozó stabil vonalakat hoztunk létre.

3.7. Genetikai kísérletek

Mitotikus klónok létrehozása a zsírtestben, P-elem remobilizálás (revertáltatás), törzsbe állítás, különböző konstrukciókat hordozó vonalak keresztezése.

3.8. Autofág struktúrák kimutatása

A frissen kiboncolt zsírtestet akridin oranzs vagy LysoTracker Red festékekkel lettek megfestve, amelyeket fixálás nélkül, fluorszcens mikroszkóppal vizsgáltunk.

3.9. Western blotok

A mintákat denaturáló poliakrilamid gélen futtattuk, majd blottolást és immunjelölést követően a második antitestben lévő alkalikus foszfatáz aktivitás segítségével hívtuk elő.

3.10. Immunhisztokémia.

Az enyhén fixált zsírtest-lebenyeket a szokásos immunhisztokémiai eljárással megfestettük, majd hagyományos fluoreszcens, vagy pedig konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.11. Fény- és elektronmikroszkópia

Az aldehides fixálás után araldit típusú műgyantába ágyztuk a mintát. A toluidinkékkel festett félvékony metszeteket fénymikroszkóppal, az ultravékony metszeteket transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

4. Eredmények és következtetések

- 4.1. Kimutattuk, hogy a metamorfózisra készülő Lepidoptera lárvák zsírtestében tömegesen jelentkező fiziológiás autofágiát a szöveti ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) szintemelkedése kíséri. Ez a változás jó összefüggést mutatott mind a fiziológiásan, mind kezelés következtében megemelkedett vedlési hormon titerrel. Kísérletesen igazoltuk, hogy dibutiril-cAMP adásával, vagy az endogén cAMP-t lebontó foszfodiészterázokat gátlásával ebben a szövetben autofágia indukálható.
- 4.2. Immunbiológiai eljárásokkal igazoltuk, hogy a rovarok képesek a zsírtest trofocitái által szintetizált savas foszfatázt a hemolimfába szekretálni, ahol az inaktív formában raktározódik. Az autofágiát kísérő heterofág folyamatok keretében a zsírtest sejtjei az enzimet a raktározó fehérjékkel egyidőben, receptor mediált endocitózissal veszik vissza és csomagolják be a protein granulumokba. Ezzel az eljárással biztosítják a metamorfózis idejére a fehérjék lebontásához szükséges enzimmennyiséget.
- 4.3. Rámutattunk, hogy a *Drosophila* lárvákban a *draut1/atg3* gén kifejeződése jelentősen megnövekszik autofágia idején. A gén RNS interferenciával történő csendesítésének mértékétől függően az autofág vakuolumok mennyisége jelentősen lecsökkent a lárvális zsírtestben. Mivel a gén kiütése megakadályozta az állatok normális fejlődését és azok pusztulásához vezetett, ezért bizonyítottan tekinthetjük, hogy a holometabola rovaroknál az autofágia nélkülözhetetlen része a metamorfózisnak.
- 4.4. Forward genetikai eljárással P-elem beépülést hordozó *Drosophila* mutánsparcokat tesztelve sikerült 18 autofág defektust hordozó vonalat találnunk. Ezek közül a következők kettőnek (1(3)S005042 és 1(3)S011027) a vizsgálati eredményei voltak különösen jelentősek.

4.5. Az *snf4aγ* gén vizsgálatakor kimutattuk, hogy terméke részt vesz a fejlődési és a stressz-indukált autofágia szabályozásában. Hiányában a trofociták sem hormonkezelés, sem pedig éhezés hatására nem képesek autofág struktúrák képzésére. A részletes genetikai elemzés rávilágított arra, hogy az autofágiával összefüggésbe hozható régiót az *snf4aγ* gén RL transzkriptumának kezdőpontja előtt lévő, mintegy 200-500 bázispár hosszúságú szakasz hordozhatja. Az *snf4aγ*-RA 9. exonját felhasználva, rekombináns fehérjét, majd ez ellen antiszérumot állítottunk elő. Ezt használva, Western blottal kimutattuk, hogy az Snf4aγ fehérje mennyisége az autofágia időszakában megemelkedik, ami tovább erősítette azt a feltételezésünket, hogy a gén terméke nélkülözhetetlen az autofág folyamathoz. Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei szerint, vad genotípusú, rendszeren táplálkozó lárvák zsírtest-sejtjeiben az SNF4Aγ fehérje citoplazmatikus lokalizációt mutat. Ezzel ellentétben viszont a vándorló korú lárvák trofocitáit vizsgálva, az immunfluoreszcens jel elsősorban a sejtmagokban jelentkezett, és ugyanezt tapasztaltuk éheztetés hatására is. Mindez arra enged következtetni, hogy az AMPK Snf4aγ alegysége nemcsak az enzimkomplex tagjaként, hanem önálló fehérjeként is képes az autofág folyamatot szabályozni.

4.6. Azok a *Drosophila* lárvák trofocitái, amelyek működésképtelen *lqf* génnel rendelkeztek, az elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint csak minimális számú lizoszómát és autofagoszómát tartalmaztak. Mivel ezek száma 20-hidroxiokdizon kezelés hatására sem növekedett meg, ez nagymértékben megerősítette a feltételezésünket, hogy az *lqf* gén terméke szintén nélkülözhetetlen része az autofág masinériának. A mitotikus klónok elemzése is alátámasztotta ezt, mivel csak a vad genotípusú klónsejtek voltak képesek az éheztetésre autofágiával válaszolni, a mutánsok nem. A gén expresszióját RT-PCR-rel vizsgálva kimutattuk, hogy mind a fejlődési, mind pedig a stressz által indukált autofágia a gén expressziójának erőteljes fokozódásához vezetett. Az általunk előállított, RNS-csendesítésre alkalmas konstrukciót hordozó transzgén vonalak egyedeinek zsírteste szintén mentes volt az autofág struktúráktól. Az *lqf* gén 6. exonjának egy szakaszát megklónoztuk, majd rekombináns fehérjét, illetve ennek alapján antiszérumot termeltettünk. Az ezzel végzett immunhisztokémiai vizsgálatok meglepő eredményt szolgáltattak. A fiatal, autofágiát nem mutató lárvák zsírtestében az Lqf protein jelenléte a sejtmag periferiáján

volt detektálható. Ez a jellegzetes lokalizáció az autofágia megindulásakor megváltozott: anélkül, hogy a sejtmag körüli jel gyengült volna, Lqf-pozitívítást mutató granulumok jelentek meg a trofociták citoplazmájában. Ezzel szemben az autofág folyamat csúcspontján az Lqf fehérje perinukleáris akkumulációja megszűnt, ugyanakkor a granulumok jelölődése igen erőteljessé vált. Mindez nagyfokú hasonlóságot mutat a TORC sejten belüli megoszlásához, ami még inkább alátámasztja az Lqf szerepét az autofágia folyamatában. A rapamicinnel történő kezelés negatív eredmény is azt igazolja, hogy a membránokba beépülni képes Lqf fehérje a TORC alatt helyezkedik el az autofág útvonalban.

5. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk:

Sass M, **Csikós G**, Kömüves L, Kovács J. (1983) Cyclic AMP in the fat body of *Mamestra brassicae* during the last instar and its possible involvement in the cellular autophagocytosis induced by 20-Hydroxyecdysone. *Gen Comp Endocrinol.* 1983 Apr;50(1):116-23.

Sass, M., Kömüves, L., **Csikós, Gy.** and Kovács, J. (1989) Changes in the activities of lysosomal enzymes in the fat body and mid gut of two Lepidopteran insects during metamorphosis. *Comp. Biochem. Physiol.* 92A, 285-289

Csikós, Gy., Sass, M. (1997) Changes of acid phosphatase content and activity in the fat body and the hemolymph of the flesh fly *Neobellieria (Sarcophaga) bullata* during metamorphosis *Arch. Insect Biochem. Phys.* 34, 369-390.

Juhász G, **Csikós G**, Sinka R, Erdélyi M, Sass M. (2003) The *Drosophila* homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett.* 2003 May 22;543(1-3):154-8.

Juhász G, **Csikós GY**, Sass M. (2001) A possible approach to study autophagy in *Drosophila*. *Acta Biol Hung.* 2001;52(4):485-90.

Tóth ML, Sigmond T, Borsos E, Barna J, Erdélyi P, Takács-Vellai K, Orosz L, Kovács AL, **Csikós G**, Sass M, Vellai T. (2008) Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy.* Apr 1;4(3):330-8.

Lippai M, **Csikós G**, Maróy P, Lukácsovich T, Juhász G, Sass M. (2008) SNF4Agamma, the *Drosophila* AMPK gamma subunit is required for regulation of developmental and stress-induced autophagy. *Autophagy.* 2008 May 16;4(4):476-86.

Csikós G, Lippai M, Lukácsovich T, Juhász G, Henn L, Erdélyi M, Maróy P, Sass M. (2009) A novel role for the *Drosophila* epsin (lqf): involvement in autophagy. *Autophagy.* 2009 Jul;5(5):636-48.